

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 1 年 9 月 2 0 日
Date of Application:

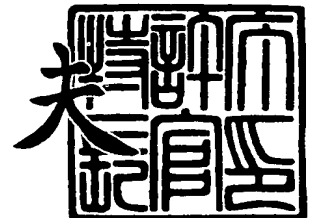
出 願 番 号 特 願 2 0 0 1 - 2 8 7 6 9 8
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 1 - 2 8 7 6 9 8]

出 願 人 科学技術振興事業団
Applicant(s):

2 0 0 4 年 4 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 0 9 8 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 13-127

【提出日】 平成13年 9月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A01K 67/027

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県静岡市瀬名川1丁目15番5号

 【氏名】 山口 正義

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

 【代表者】 沖村 憲樹

【代理人】

 【識別番号】 100107984

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 044347

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 0013099

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 レギュカルチン過剰発現モデル動物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 レギュカルチン遺伝子が導入され、レギュカルチンを過剰発現することを特徴とするトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 2】 サイトメガロウイルス－I E エンハンサー、チキン β －アクチンプロモーター、レギュカルチン遺伝子、ラビット β －グロビンポリ A シグナルの順に配列された直鎖 DNA が導入されたことを特徴とする請求項 1 記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 3】 レギュカルチン遺伝子が、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 4】 配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子が、配列表の配列番号 1 記載の DNA 配列からなるラットレギュカルチン遺伝子であることを特徴とする請求項 3 記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 5】 ホモ体であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 6】 体重増加抑制能を有することを特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 7】 大脳機能障害発症性であることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 8】 インスリン非依存性糖尿病発症性であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 9】 腎性高血圧発症性であることを特徴とする請求項 1～8 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 10】 尿細管再吸収障害発症性であることを特徴とする請求項 1～9 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 11】 非ヒト動物がラットであることを特徴とする請求項 1～10 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。

0 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 12】 請求項 1～11 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物を用いることを特徴とするレギュカルチンの製造方法。

【請求項 13】 請求項 1～11 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物又は該トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官もしくは細胞と被検物質とを用いることを特徴とするレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 14】 トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を投与し、該トランスジェニック非ヒト動物における体重増加の程度を測定・評価することを特徴とする請求項 13 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 15】 レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、大脳機能障害であることを特徴とする請求項 13 又は 14 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 16】 レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、インスリン非依存性糖尿病であることを特徴とする請求項 13 又は 14 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 17】 レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、腎性高血圧であることを特徴とする請求項 13 又は 14 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 18】 レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、尿細管再吸収障害であることを特徴とする請求項 13 又は 14 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 19】 請求項 13～18 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬。

【請求項 20】 請求項 1～11 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物又は該トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官もしくは細胞と被検物質とを用いることを特徴とするレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法。

【請求項 21】 トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を投与し、該トランスジェニック非ヒト動物における体重減少の程度を測定・評価することを特徴とする請求項 20 記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法。

【請求項 22】 レギュカルチン発現低下に起因する疾病が、骨粗鬆症であることを特徴とする請求項 20 又は 21 記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法。

【請求項 23】 レギュカルチン発現低下に起因する疾病が、動脈硬化心筋梗塞であることを特徴とする請求項 20 又は 21 記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法。

【請求項 24】 レギュカルチン発現低下に起因する疾病が、心筋梗塞であることを特徴とする請求項 20 又は 21 記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法。

【請求項 25】 請求項 20～24 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、レギュカルチン遺伝子導入トランスジェニック非ヒト動物、詳しくは、レギュカルチン遺伝子が導入され体重増加抑制能を有するトランスジェニック非ヒト動物や、かかるトランスジェニック非ヒト動物を用いるレギュカルチンの製造方法や、レギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法や、レギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法等に関する。

【0002】

【従来の技術】

ペプチドホルモンが細胞膜の受容体に結合し、細胞内にその情報を伝達する仕組みの中で、 Ca^{2+} は主役を演じている。細胞内には Ca^{2+} を結合する多くのタンパク質が存在するが、その作用を増幅するタンパク質として、カルモジュリン

は重要な役割を果たしており、 Ca^{2+} はこのカルモジュリンに結合し、細胞機能の調節に関与する各種の酵素を活性化することが解明されている (Science, 202, 19-27, 1984)。また、 Ca^{2+} がプロテインキナーゼCやその他の Ca^{2+} 結合タンパク質 (酵素も含む) に作用することも知られている (Science, 233, 305-312, 1986)。レギュカルチンも、本発明者らによりラット肝細胞質から単離された Ca^{2+} 結合蛋白質である。

【0003】

レギュカルチンは、分子量が33388の Ca^{2+} 結合タンパク質で、その Ca^{2+} 結合定数が $4.19 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ を示し、6～7個の高親和性 Ca^{2+} 結合部位を持ち、 α -ヘリックス構造を34%含む、肝臓に顕著に存在する等電点pI 5.20の酸性蛋白質である。レギュカルチンは、カルモジュリンや他の多くの Ca^{2+} 結合タンパク質にみられる部位EFハンド構造 (領域) を含まない特異なタンパク質で、例えば、 Ca^{2+} を結合することにより、カルモジュリンは α -ヘリックス含量が増加し、その構造が堅固になるが、レギュカルチンは α -ヘリックス含量が減少する。また一方、細胞機能調節において、レギュカルチンは、カルモジュリンによる酵素活性化を阻害し、プロテインキナーゼCの活性化をも阻害することが明らかになっている。このように、レギュカルチンは、シグナリングの制御タンパク質として機能するなど多くの知見が蓄積されている (FEBS Lett, 327, 251-255, 1993)。

【0004】

レギュカルチン遺伝子は、ラットにおいてX染色体 (Xq 11.1-12) に存在し、ヒトにおいてもX染色体に位置する。レギュカルチン遺伝子は、ラットやヒトの他、サル、マウス、イヌ、ウシ、ウサギ、ニワトリ等の高等動物に見い出されているが酵母ではなく、高度に分化されたタンパク質をコードするものと考えられている。レギュカルチンcDNAはクローニングされており、その全構造も決定されている (特開平7-123985号公報)。ラット肝のレギュカルチンcDNAは、全アミノ酸をコードする塩基対が0.897 kbであり、299のアミノ酸を翻訳する。また、マウス肝やヒト肝のレギュカルチンcDNAの塩基配列も決定されており、ラット肝のレギュカルチンcDNAと比較して、それぞれ9

4%と約89%のホモロジーを有している。レギュカルチンmRNAの発現は、ヒト、ラット、マウス、ウシ、ニワトリ等の肝臓においてみられ、これらの肝臓にはレギュカルチンタンパク質の存在も確認されている。

【0005】

レギュカルチンは、多機能性を有する細胞内 Ca^{2+} シグナリングの制御蛋白質として特徴を有する蛋白質であり、細胞機能調節に關与する重要な蛋白質であることが知られている (Life Sciences 66, 1769-1780, 2000、Biochemical and Biophysical Research Communications 276, 1-6, 2000)。また、生体内における肝臓や腎臓におけるレギュカルチンの発現が肝障害 (Molecular and Cellular Biochemistry 131, 173-179, 1994) や腎障害 (Molecular and Cellular Biochemistry 151, 55-60, 1995) 時に低下することが動物実験的に明らかにされており、レギュカルチンと病態成因との関連が示唆されている。そして、GOT、GPT等の既存の肝機能マーカーと異なって肝臓に特異的に存在するレギュカルチンの血清中の濃度を測定することにより、肝疾患患者血清を鑑別する方法、すなわち、肝疾患患者の血清ではレギュカルチンが有意に上昇している一方、健常人の血清ではレギュカルチンはほとんど検出されず、その測定が肝疾患患者血清の鑑別手段として有用であることも知られている (特開平10-26623号公報)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

レギュカルチンタンパク質は、肝臓に特異発現される他、腎臓、心臓、大脳 (神経細胞) にも低レベルで発現し、細胞内の Ca^{2+} シグナリング関連細胞機能の調節に關与し、その発現が低下すると生理的異常を來たす特異な多機能性蛋白質であり、これまでラットの肝臓から単離した蛋白質や抗レギュカルチンモノクローナル抗体を用いて、その機能解析が行われ、上記のカルシウムシグナルの制御因子としての役割の他、細胞内カルシウム輸送酵素の調節や、プロテアーゼの活性化因子としての役割や、細胞核のカルシウム輸送の調節、細胞核DNA分解における役割、肝再生時の細胞核機能における役割等の細胞核機能の調節や、腎尿細管カルシウム再吸収における役割など、多くの生体調節におけるレギュカルチ

ンの機能的役割が本発明者により明らかにされている。

【0007】

本発明者は、レギュカルチンの種々の機能的役割の解明についての研究過程で、レギュカルチンが他の数多くの Ca^{2+} 結合タンパク質とは異なる特異的作用を有する点に着目し、カルシウムが関与する各種細胞の機能調節は、生体内におけるレギュカルチンの発現量とカルモジュリンをはじめとする他の数多くの Ca^{2+} 結合タンパク質の発現量とのバランスの上に成立していると考え、レギュカルチンの発現量と他の数多くの Ca^{2+} 結合タンパク質の発現量とのバランスが崩れた場合に、生体に生じる変化・影響を調べることにした。本発明の課題は、元来高等動物の肝臓等に発現しているレギュカルチンを過剰に発現させ、他の数多くの Ca^{2+} 結合タンパク質とのバランスを崩した場合に、生体にどのような変化・影響が生じるかを調べるためのツールであるレギュカルチン過剰発現モデル動物を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため、ラット肝臓cDNAライブラリーからレギュカルチンcDNAをクローニングし、レギュカルチン蛋白質の全長をコードするcDNAを単離し、このラットレギュカルチン全長cDNAよりORFを切り出し、発現ベクター(pCXN2)に導入し、この遺伝子発現ベクターをラット受精卵雄性前核にマイクロインジェクションし、この受精卵を仮親ラットの卵管に移植し、子ラットを発生させ、その産仔の組織からDNAを抽出し、PCR法によってレギュカルチンcDNAが組み込まれているラットを確認したところ、29匹の産子からレギュカルチンcDNAを発現するホモ体のラット5匹(雄4匹、雌1匹)が作出され、かかるトランスジェニックラットの体重の増加が有意に抑制されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち本発明は、レギュカルチン遺伝子が導入され、レギュカルチンを過剰発現することを特徴とするトランスジェニック非ヒト動物(請求項1)や、サイトメガロウイルス-IEエンハンサー、チキン β -アクチンプロモーター、レギ

ユカルチン遺伝子、ラビット β -グロビンポリ A シグナルの順に配列された直鎖 DNA が導入されたことを特徴とする請求項 1 記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 2）や、レギュカルチン遺伝子が、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 3）や、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子が、配列表の配列番号 1 記載の DNA 配列からなるラットレギュカルチン遺伝子であることを特徴とする請求項 3 記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 4）や、ホモ体であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 5）や、体重増加抑制能を有することを特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 6）や、大脳機能障害発症性であることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 7）や、インスリン非依存性糖尿病発症性であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 8）や、腎性高血圧発症性であることを特徴とする請求項 1～8 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 9）や、尿細管再吸収障害発症性であることを特徴とする請求項 1～9 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 10）や、非ヒト動物がラットであることを特徴とする請求項 1～10 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 11）に関する。

【0010】

また本発明は、請求項 1～11 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物を用いることを特徴とするレギュカルチンの製造方法（請求項 12）や、請求項 1～11 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物又は該トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官もしくは細胞と被検物質とを用いることを特徴とするレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項 13）や、トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を投与し、該トランスジェニック非ヒト動物における体重増加の程度を測定・評価することを特徴とする請求項 13 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項 14）や、レギュカルチン過剰発現に起因

する疾病が、大脳機能障害であることを特徴とする請求項 13 又は 14 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項 15）や、レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、インスリン非依存性糖尿病であることを特徴とする請求項 13 又は 14 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項 16）や、レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、腎性高血圧であることを特徴とする請求項 13 又は 14 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項 17）や、レギュカルチン過剰発現に起因する疾病が、尿細管再吸収障害であることを特徴とする請求項 13 又は 14 記載のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項 18）や、請求項 13～18 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られるレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬（請求項 19）に関する。

【0011】

さらに本発明は、請求項 1～11 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト動物又は該トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官もしくは細胞と被検物質とを用いることを特徴とするレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法（請求項 20）や、トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を投与し、該トランスジェニック非ヒト動物における体重減少の程度を測定・評価することを特徴とする請求項 20 記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法（請求項 21）や、レギュカルチン発現低下に起因する疾病が、骨粗鬆症であることを特徴とする請求項 20 又は 21 記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法（請求項 22）や、レギュカルチン発現低下に起因する疾病が、動脈硬化心筋梗塞であることを特徴とする請求項 20 又は 21 記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法（請求項 23）や、レギュカルチン発現低下に起因する疾病が、心筋梗塞であることを特徴とする請求項 20 又は 21 記載のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法（請求項 24）や、請求項 20～24 のいずれか記載のスクリーニング方

法により得られるレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質（請求項 25）に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明のトランスジェニック非ヒト動物としては、レギュカルチン遺伝子が導入され、レギュカルチンを過剰発現する非ヒト動物であれば特に制限されるものではなく、ここで、レギュカルチンを過剰発現するとは、野生型の非ヒト動物のレギュカルチン発現量に比べて有意に多量のレギュカルチンを発現することをいう。また、上記非ヒト動物としては、ラット、マウス、ウシ、ブタ、ニワトリ、カエル、ヒト、イヌ、ウサギ等を挙げることができるが、中でもラットが好ましい。モデル動物としてよく用いられているマウスでは臓器が小さく病態の解析には限界があることもあるが、例えば血圧測定などラットにおいてはこれが可能になり、病態解明や遺伝子治療のための動物実験的手段としてきわめて有用となる。

【0013】

本発明のトランスジェニック非ヒト動物の好ましい態様として、サイトメガロウイルス－I E エンハンサー、チキン β －アクチンプロモーター、レギュカルチン遺伝子、ラビット β －グロビンポリ A シグナルの順に配列された直鎖 DNA が導入されたトランスジェニック非ヒト動物を挙げることができる。例えば、マーカ－遺伝子、サイトメガロウイルス－I E エンハンサー、チキン β －アクチンプロモーター、cDNA 挿入サイト、ラビット β －グロビンポリ A シグナル等を有する発現ベクター（pCXN2）にレギュカルチン全長 cDNA を導入したものをを用いると、効率よくトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。

【0014】

また、本発明のトランスジェニック非ヒト動物の好ましい態様として、レギュカルチン遺伝子が、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子であるトランスジェニック非ヒト動物、特に、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子が、配列表の配列番号 1 記載の DNA 配列からなるラットレギュカルチン遺伝子であるトラン

スジェニック非ヒト動物を挙げることができるが、レギュカルチン遺伝子の由来としては、ラットその他、マウス、ウシ、ブタ、ニワトリ、カエル、ヒト、イヌ、ウサギ等特に制限されるものではない。

【0015】

また、本発明のトランスジェニック非ヒト動物の好ましい態様として、ホモ体であるトランスジェニック非ヒト動物を挙げることができる。かかる変異染色体をホモに有するホモ体は、染色体をヘテロに有するラット等の非ヒト動物同士を交配することにより得ることができ、レギュカルチン発現量がヘテロ体よりも多いことから、実験モデル動物として特に好ましい。また、本発明のトランスジェニック非ヒト動物として、体重の増加が野生型の非ヒト動物に比べて有意に抑制された、すなわち体重増加抑制能を有するトランスジェニック非ヒト動物を好適に挙げることができる。レギュカルチン遺伝子が導入され、レギュカルチンを過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物が、かかる体重増加抑制能を有することは全く予想できなかったことであり、この新たな知見はレギュカルチンが肥満防止剤としての有用性をもつ可能性があることを示唆している。かかる新たな知見からして、本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、レギュカルチン遺伝子が導入され、レギュカルチンを過剰発現することを特徴とする体重増加抑制能を有するトランスジェニック非ヒト動物ということもできる。

【0016】

また、本発明のトランスジェニック非ヒト動物の好ましい態様として、大脳機能障害発症性、インスリン非依存性糖尿病発症性、腎性高血圧発症性、尿細管再吸収障害発症性等のレギュカルチン過剰発現に起因する症状や疾病のうち少なくとも1以上の症状や疾病を発現するトランスジェニック非ヒト動物を挙げることができる。大脳機能障害は、大脳の記憶維持メカニズム上必要とされるCa²⁺-カルモジュリン依存性タンパク質リソ酸化酵素の活性化を、過剰発現したレギュカルチンが抑制して、神経細胞内の神経伝達を制御することにより発症するものと考えられ、本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、記憶などの大脳機能の障害（アルツハイマー等の痴呆症）の実験モデル動物として有用である。また、レギュカルチンは、肝臓や腎臓において発現し、ホルモンの細胞内情報伝達の制御

を行っており、レギュカルチンの過剰発現により、肝臓と腎臓の機能を調節するホルモンの作用発現が障害され、肝臓においては、インスリンの働きを抑制することからインスリン非依存性糖尿病を誘発し、腎臓においては、レニン-アンジオテンシン系に関係した腎性高血圧、さらに電解質代謝に関連した尿細管再吸収障害を誘発するものと考えられ、本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、インスリン非依存性糖尿病、腎性高血圧、尿細管再吸収障害等の実験モデル動物として有用である。

【0017】

本発明の体重増加抑制能を有するモデルラット等のモデル動物の樹立方法としては、公知のトランスジェニック動物の作製方法（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384, 1980）を用いた方法を挙げることができる。例えば、レギュカルチン（RC）トランスジェニックラットを創製する方法としては、ラット肝臓 cDNA ライブラリーからレギュカルチンの cDNA をクローニングし、レギュカルチンタンパク質の全長をコードする cDNA を単離後、オープンリーディングフレーム（ORF）を切り出し、発現ベクターに導入し、この遺伝子発現ベクターをリニアライズした導入遺伝子を含む直鎖 DNA フラグメントをラット受精卵雄性前核にマイクロインジェクションし、この受精卵あるいは 2 細胞期胚を仮親ラットの卵管に移植し、子ラットを発生させ、その産仔の組織から抽出した DNA を用いて PCR 法等により、レギュカルチン cDNA が組み込まれていることを確認する方法等を挙げることができる。

【0018】

本発明のレギュカルチンの製造方法としては、本発明のトランスジェニック非ヒト動物、好ましくはホモ体のトランスジェニック非ヒト動物を用いる方法であれば特に制限されるものではなく、例えば、ホモ体のレギュカルチントランスジェニックラットから肝臓を取り出し、そのホモジネートから文献（Chem. Pharm. Bull. 26, 1915-1918, 1978）記載の方法に準じて、レギュカルチンを単離・精製することができる。また、レギュカルチンの増収を目的として、トランスジェニック非ヒト動物にカルシウム、カルチトニン、インスリン、エストロゲン等を投与することもできる。

【0019】

本発明のレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法としては、本発明のトランスジェニック非ヒト動物又は該トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官もしくは細胞と被検物質とを用いる方法であれば特に制限されるものではなく、上記レギュカルチン過剰発現に起因する疾病としては、大脳機能障害、インスリン非依存性糖尿病、腎性高血圧、尿細管再吸収障害等を例示することができる。上記トランスジェニック非ヒト動物と被検物質とを用いる方法としては、トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を直接投与し、該トランスジェニック非ヒト動物における体重増加の程度や、レギュカルチン過剰発現に起因する疾病の程度を測定・評価する方法や、被検物質投与後のトランスジェニック非ヒト動物から得られる組織、器官又は細胞におけるレギュカルチンの発現抑制量の程度を測定・評価する方法や、組織や器官における形態変化をモノクローナル抗体による免疫染色法や電子顕微鏡により評価する方法などを挙げることができる。また、トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官又は細胞と被検物質とを用いる方法としては、トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官又は細胞を被検物質の存在下で培養し、該組織、器官又は細胞のレギュカルチンの発現抑制量の程度を測定・評価する方法や、組織や器官における形態変化をモノクローナル抗体による免疫染色法や電子顕微鏡により評価する方法などを挙げることができる。

【0020】

上記組織や器官としては、肝臓、腎臓尿細管、心臓、大脳等を、細胞としてはこれら組織や器官を構成する肝細胞、神経細胞等を具体的に挙げることができる。また、これらのスクリーニングに際して、野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物における場合と比較・評価することが、個体レベルで正確な比較実験をすることができることから好ましい。このように、上記本発明のスクリーニング方法によると、レギュカルチン過剰発現に起因する疾病、例えば大脳機能障害、インスリン非依存性糖尿病、腎性高血圧、尿細管再吸収障害等の予防・治療薬をスクリーニングすることができ、かかるスクリーニング方法により得られるレギュカルチン過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬も本発明の範疇に含まれ

る。

【0021】

本発明のレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質のスクリーニング方法としては、本発明のトランスジェニック非ヒト動物又はトランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官もしくは細胞と被検物質とを用いる方法であれば特に制限されるものではなく、レギュカルチン発現低下に起因する疾病としては、骨粗鬆症、動脈硬化、心筋梗塞等を例示することができる。上記トランスジェニック非ヒト動物と被検物質とを用いる方法としては、トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を直接投与し、該トランスジェニック非ヒト動物における体重減少の程度や、レギュカルチン発現低下に起因する疾病の程度を測定・評価する方法や、被検物質投与後のトランスジェニック非ヒト動物から得られる組織、器官又は細胞におけるレギュカルチンの発現増加量の程度を測定・評価する方法や、組織や器官における形態変化をモノクローナル抗体による免疫染色法や電子顕微鏡により評価する方法などを挙げることができる。また、トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官又は細胞と被検物質とを用いる方法としては、トランスジェニック非ヒト動物由来の組織、器官又は細胞を被検物質の存在下で培養し、該組織、器官又は細胞のレギュカルチンの発現増加量の程度を測定・評価する方法や、組織や器官における形態変化をモノクローナル抗体による免疫染色法や電子顕微鏡により評価する方法などを挙げることができる。

【0022】

上記組織や器官としては、肝臓、腎臓尿管、心臓、大脳等を、細胞としてはこれら組織や器官を構成する肝細胞、神経細胞等を具体的に挙げることができる。また、これらのスクリーニングに際して、野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物における場合と比較・評価することが、個体レベルで正確な比較実験をすることができることから好ましい。このように、上記本発明のスクリーニング方法によると、レギュカルチン発現低下に起因する疾病、例えば骨粗鬆症、動脈硬化、心筋梗塞等の原因物質をスクリーニングすることができ、かかるスクリーニング方法により得られるレギュカルチン発現低下に起因する疾病の原因物質は、レギュカルチンの生体内における作用・役割をより一層明らかにする上で

有用であり、また、これら原因物質に結合する物質等その作用を阻害する物質をスクリーニングすることにより、レギュカルチン発現低下に起因する疾病の予防・治療薬を開発することができる可能性があることからしても有用であり、かかる原因物質も本発明の範疇に含まれる。

【0023】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例1 [ラットRCcDNA調製]

(RNAの調製)

ウイスター系雄性ラット（3週齢）から肝臓を摘出し、グアニジン－イソチオシアネート液（4Mグアニジニウムチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム（pH7.0）、0.5%サルコシル、0.1M2－メルカプトエタノール、2M酢酸ナトリウム）でホモジナイズした。これをフェノール－クロロホルム－イソアミルアルコール混液で抽出し、4℃、10,000×gで20分遠心した。水層にイソプロパノールを加え、－20℃で放置し、RNAを沈澱させた。回収した沈澱はジエチルピロカーボネート処理した0.5%ドデシル硫酸ナトリウムに溶解した。これをオリゴ（dT）セルロースカラムに通し、ポリ（A）＋RNAを精製した。

【0024】

(cDNAライブラリーの作製)

精製したポリ（A）＋RNA（5μg）に50unitのMoloney-Murine Leukemiaウイルス逆転写酵素とオリゴ（dT）18プライマーリンカーを添加し、1本鎖cDNAを合成した。さらに合成した1本鎖cDNAに大腸菌リボヌクレアーゼHとDNAポリメラーゼIを添加し、2本鎖cDNAを合成した。これにEcoRIアダプターを付加し、XhoI, EcoRIで消化したファージ発現ベクター（λZAPII）と連結した。さらにパッケージングエキストラクトを用いてファージにパッケージングしcDNAライブラリーのファージを作製した。

【0025】

(RC cDNA クローンの選抜)

ラット肝の cDNA ライブラリーのファージ約 1×10^6 個を大腸菌と混合し 20 個の寒天プレートに植菌した。42℃で3時間半インキュベートした後、プレートに 10 mM イソプロピルチオ β -D-ガラクトシドで処理したニトロセルロース膜をのせ、37℃で3時間半インキュベートした。ニトロセルロース膜はブロッキングした後、抗 RC ウサギ血清 ($\times 200$) と室温で2時間インキュベートした。膜は洗浄した後、アルカリホスファターゼ結合抗ウサギ IgG 抗体を加えインキュベートした。これを発色液 (0.35 mM ニトロブルーテトラゾリウム, 0.4 mM 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート) に浸し発色させ、RC cDNA 陽性プラークを同定した。

【0026】

(プラスミドベクターへのサブクロニング)

ファージベクター λ ZAPII は、その配列中にプラスミドベクターである pBluescript の塩基配列を含み、 λ ZAPII にクローニングされた RC の cDNA 断片はこの pBluescript に挿入されている。また、pBluescript の両端にはヘルパーファージの複製開始点と終結点が存在している。そこで同定したプラークよりファージを単離し、R408 ヘルパーファージとともに大腸菌 SURE に感染させ、RC の cDNA 断片を含む pBluescript を大腸菌内で合成させ、ヘルパーファージの形で大腸菌体外に放出させた。このファージ液をさらに大腸菌 SURE に感染させ、RC の cDNA 断片を有するプラスミドとして菌内で複製させた。この大腸菌を 50 μ g/ml アンピシリン含有の LB プレートに植菌し、アンピシリン耐性コロニーを選択した。

【0027】

(cDNA インサートの塩基配列の決定)

Sequenase システム (US Biochemical 社製) を用いて cDNA インサートの全塩基配列を決定した。すなわちプラスミド DNA を EcoRI で切断し、断片はアルカリ変性処理した後、プライマーを加えアニーリングした。これに 35 S dCTP、0.1 M DTT、Sequenase 用酵素液を添加した後4等分し、各々に ddATP、ddGTP、ddTTP、ddCTP を加え、37℃5分間イ

ンキュベートした。これらはアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーを行ない、塩基配列を読み取った。配列番号 1 にレギュカルチン cDNA の全塩基配列を示す。また、得られたアミノ酸配列も配列番号 2 に示す。これから計算されるレギュカルチンの分子量は 33,388 であった。この値は精製したレギュカルチンを SDS ポリアクリルアミド電気泳動法により算出した分子量と一致した。

【0028】

実施例 2 [トランスジェニックラットの創製]

(導入遺伝子の構築)

実施例 1 で得られたラットレギュカルチン全長 cDNA を含むプラスミド、RC-900 (glycerol stock; RC-F)、ベクター pBluescript SK (-) より、ORF 全てを含む DNA 断片を PstI を用いて切り出した (図 1A)。この切り出した PstI フラグメントを pBluescript II KS(+) の PstI サイトに組み込んだ (図 1B)。次に EcoRI で切り出し、得られた EcoRI フラグメント (図 2A) を、発現ベクター pCXN2 (クロンテック社) (Gene 108, 193-199, 1991) の EcoRI サイトに導入し (図 2B)、ラットレギュカルチン発現ベクター RC/pCXN2 を調製した。この RC/pCXN2 を SalI と SfiI と MluI で切断し、リニアライズされた 3.6 kbp のフラグメントを得た (図 3)。

【0029】

(トランスジェニックラットの作製)

ラットの前核期受精卵への上記リニアライズされた 3.6 kbp の DNA フラグメント溶液のマイクロインジェクションは下記の要領で実施した。4 週齢のスプレーグ・ドーリー (SD, Sprague-Dawley) 系雌ラットを明暗サイクル 12 時間 (明時間 4:00~16:00)、温度約 23℃、湿度約 55% で飼育し、膣スメア法により雌の性周期を観察してホルモン処理日を選択した。雌ラットに 150 IU/kg の妊馬血清性腺刺激ホルモン (日本全薬社製「PMSゼンヤク」) を腹腔内投与して過剰排卵処理を行い、その 48 時間後に 150 IU/kg のヒト胎盤性性腺刺激ホルモン (三共エール薬品 (株) 社製「プベローゲン」) を腹腔内投与した後、雄との同居により交配を行わせ、ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン

投与 3 2 時間後に卵管灌流により前核期受精卵を採取した。

【0 0 3 0】

この様にして調製したウイスターラットの受精卵の雄性前核に、前記 3 . 6 k b p の DNA フラグメント溶液 (5 n g / μ l 濃度) を顕微注入した。DNA フラグメントが注入された卵を、C O₂ インキュベーター内で m - K R B (m - クレブスリンガー緩衝液) 培地を用いて 1 晩培養した。翌日 2 細胞へと発生が進み、異常の認められない 2 細胞期胚を 9 匹の仮親 (精管結紮雄と交配させた偽妊娠雌ラット) の卵管内に 1 匹あたり 2 0 ~ 3 0 個程度を移植し、2 9 匹の産仔を得た。4 週齢まで生存した 2 7 匹の産仔の尾より DNA を採取し、採取した DNA をプライマー huRC-1 ; GGAGGCTATGTTGCCACCATTTGA (配列番号 3) 、プライマー huRC-2 ; CCCTCCAAAGCAGCATGAAGTTG (配列番号 4) を用いて P C R 法により検定した (図 4) 。その結果、合計 5 匹 (雄 4 匹、雌 1 匹) のラットに導入遺伝子の存在を確認した。そのうち 5 匹が次世代に導入遺伝子を伝えた。

【0 0 3 1】

実施例 3 [体重増加抑制能]

実施例 2 で得られたトランスジェニックラット (ヘテロ体) の系統の内、尾組織におけるレギュカルチン発現量が最も多い系統同士を交配することにより、トランスジェニックラット (ホモ体) を得た。また、ホモ体であることは、ラット尾組織より抽出したゲノム DNA への導入遺伝子の組み込みを P C R 法にて確認し、ヘテロ体の c D N A 量の 2 倍以上の組み込み量を検出することにより確認した。かかるホモ体のトランスジェニックラットを用いて体重増加抑制能について調べた。3 ~ 4 週齢の野生型 S D ラットとトランスジェニックラット (ホモ体) それぞれ 8 匹ずつの体重の平均値を表 1 に示す。Student's t test, $P < 0 . 0 1$ 、平均値 \pm 標準誤差で表し有意差が認められ、レギュカルチン遺伝子の過剰発現により、体重増加が抑制されることを確認することができた。

【0 0 3 2】

【表 1】

	体 重 (n=8)
野 生 型	88.5 ± 3.8 g
Tg (ホモ体)	69.5 ± 2.4 g

【0033】

【発明の効果】

本発明のレギュカルチントランスジェニック非ヒト動物、特にレギュカルチントランスジェニックラットは、肝障害、腎障害、糖尿病、心筋梗塞、高血圧、アルツハイマーなど Ca^{2+} シグナリングが関与する成人病、生活習慣病、老人病など病態評価用実験モデル動物として有用である。また、レギュカルチンは細胞内 Ca^{2+} シグナリングに関連した細胞機能を調節しており、本発明のレギュカルチントランスジェニック非ヒト動物はかかるレギュカルチンを過剰発現することから、臓器特異的な病態（肝癌、心筋梗塞、大脳痴呆症）の修復・改善のための遺伝子治療薬開発のためのモデル動物として有用な手段になりうる。

【0034】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Regucalcin gene-transferred non-human animals

<130> 13-217

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 900

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(900)

<400> 1

atg tct tcc atc aag att gaa tgt gtt tta agg gag aac tac agg tgt 48
Met Ser Ser Ile Lys Ile Glu Cys Val Leu Arg Glu Asn Tyr Arg Cys
1 5 10 15

ggg gag tcc cct gtg tgg gag gag gca tca aag tgt ctg ctg ttt gta 96
Gly Glu Ser Pro Val Trp Glu Glu Ala Ser Lys Cys Leu Leu Phe Val
20 25 30

gac atc cct tca aag act gtc tgc cga tgg gat tcg atc agc aat cga 144
Asp Ile Pro Ser Lys Thr Val Cys Arg Trp Asp Ser Ile Ser Asn Arg
35 40 45

gtg cag cga gtt ggt gta gat gcc cca gtc agt tca gtg gca ctt cga 192
Val Gln Arg Val Gly Val Asp Ala Pro Val Ser Ser Val Ala Leu Arg
50 55 60

cag tca gga ggc tat gtt gcc acc att gga acc aag ttc tgt gct ttg 240
Gln Ser Gly Gly Tyr Val Ala Thr Ile Gly Thr Lys Phe Cys Ala Leu
65 70 75 80

aac tgg gaa gat caa tca gta ttt atc cta gcc atg gtg gat gaa gat 288
Asn Trp Glu Asp Gln Ser Val Phe Ile Leu Ala Met Val Asp Glu Asp
85 90 95

aag aaa aac aat cga ttc aat gat ggg aag gtg gat cct gct ggg aga 336
Lys Lys Asn Asn Arg Phe Asn Asp Gly Lys Val Asp Pro Ala Gly Arg
100 105 110

tac ttt gct ggt acc atg gct gag gaa acc gcc cca gct gtt ctg gag 384
Tyr Phe Ala Gly Thr Met Ala Glu Glu Thr Ala Pro Ala Val Leu Glu
115 120 125

cgg cac caa ggg tcc ttg tac tcc ctt ttt cct gat cac agt gtg aag 432
Arg His Gln Gly Ser Leu Tyr Ser Leu Phe Pro Asp His Ser Val Lys
130 135 140

aaa tac ttt aac caa gtg gat atc tcc aat ggt ttg gat tgg tcc ctg 480
Lys Tyr Phe Asn Gln Val Asp Ile Ser Asn Gly Leu Asp Trp Ser Leu
145 150 155 160

gac cat aaa atc ttc tac tac att gac agc ctg tcc tac act gtg gat 528
Asp His Lys Ile Phe Tyr Tyr Ile Asp Ser Leu Ser Tyr Thr Val Asp
165 170 175

gcc ttt gac tat gac ctg cca aca gga cag att tcc aac cgc agg act 576

Ala Phe Asp Tyr Asp Leu Pro Thr Gly Gln Ile Ser Asn Arg Arg Thr
 180 185 190

gtt tac aag atg gaa aaa gat gaa caa atc cca gat gga atg tgc att 624
 Val Tyr Lys Met Glu Lys Asp Glu Gln Ile Pro Asp Gly Met Cys Ile
 195 200 205

gat gtt gag ggg aag ctt tgg gtg gcc tgt tac aat gga gga aga gta 672
 Asp Val Glu Gly Lys Leu Trp Val Ala Cys Tyr Asn Gly Gly Arg Val
 210 215 220

att cgc cta gat cct gag aca ggg aaa aga ctg caa act gtg aag ttg 720
 Ile Arg Leu Asp Pro Glu Thr Gly Lys Arg Leu Gln Thr Val Lys Leu
 225 230 235 240

cct gtt gat aaa aca act tca tgc tgc ttt gga ggg aag gat tac tct 768
 Pro Val Asp Lys Thr Thr Ser Cys Cys Phe Gly Gly Lys Asp Tyr Ser
 245 250 255

gaa atg tac gtg aca tgt gcc agg gat ggg atg agc gcc gaa ggt ctt 816
 Glu Met Tyr Val Thr Cys Ala Arg Asp Gly Met Ser Ala Glu Gly Leu
 260 265 270

ttg agg cag cct gat gct ggt aac att ttc aag ata aca ggt ctt ggg 864
 Leu Arg Gln Pro Asp Ala Gly Asn Ile Phe Lys Ile Thr Gly Leu Gly
 275 280 285

gtc aaa gga att gct cca tat tcc tat gca ggg taa 900
 Val Lys Gly Ile Ala Pro Tyr Ser Tyr Ala Gly

290

295

300

<210> 2

<211> 299

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Met Ser Ser Ile Lys Ile Glu Cys Val Leu Arg Glu Asn Tyr Arg Cys

1

5

10

15

Gly Glu Ser Pro Val Trp Glu Glu Ala Ser Lys Cys Leu Leu Phe Val

20

25

30

Asp Ile Pro Ser Lys Thr Val Cys Arg Trp Asp Ser Ile Ser Asn Arg

35

40

45

Val Gln Arg Val Gly Val Asp Ala Pro Val Ser Ser Val Ala Leu Arg

50

55

60

Gln Ser Gly Gly Tyr Val Ala Thr Ile Gly Thr Lys Phe Cys Ala Leu

65

70

75

80

Asn Trp Glu Asp Gln Ser Val Phe Ile Leu Ala Met Val Asp Glu Asp

85

90

95

Lys Lys Asn Asn Arg Phe Asn Asp Gly Lys Val Asp Pro Ala Gly Arg

100

105

110

Tyr Phe Ala Gly Thr Met Ala Glu Glu Thr Ala Pro Ala Val Leu Glu

115

120

125

Arg His Gln Gly Ser Leu Tyr Ser Leu Phe Pro Asp His Ser Val Lys

130

135

140

Lys Tyr Phe Asn Gln Val Asp Ile Ser Asn Gly Leu Asp Trp Ser Leu

145

150

155

160

Asp His Lys Ile Phe Tyr Tyr Ile Asp Ser Leu Ser Tyr Thr Val Asp
165 170 175
Ala Phe Asp Tyr Asp Leu Pro Thr Gly Gln Ile Ser Asn Arg Arg Thr
180 185 190
Val Tyr Lys Met Glu Lys Asp Glu Gln Ile Pro Asp Gly Met Cys Ile
195 200 205
Asp Val Glu Gly Lys Leu Trp Val Ala Cys Tyr Asn Gly Gly Arg Val
210 215 220
Ile Arg Leu Asp Pro Glu Thr Gly Lys Arg Leu Gln Thr Val Lys Leu
225 230 235 240
Pro Val Asp Lys Thr Thr Ser Cys Cys Phe Gly Gly Lys Asp Tyr Ser
245 250 255
Glu Met Tyr Val Thr Cys Ala Arg Asp Gly Met Ser Ala Glu Gly Leu
260 265 270
Leu Arg Gln Pro Asp Ala Gly Asn Ile Phe Lys Ile Thr Gly Leu Gly
275 280 285
Val Lys Gly Ile Ala Pro Tyr Ser Tyr Ala Gly
290 295

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer huRC-1

<400> 3

ggaggctatg ttgccacat tgga

24

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer huRC-2

<400> 4

ccctccaaag cagcatgaag ttg

23

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明のトランスジェニックラット作製用発現ベクター構築における、ラットレギュカルチン全長 c D N A より O R F 部分を切り出す過程を示す図である。

【図 2】

本発明のトランスジェニックラット作製用発現ベクター構築における、ラットレギュカルチン全長 c D N A の O R F 部分を発現ベクター p C X N 2 に導入する過程を示す図である。

【図 3】

本発明のトランスジェニックラット作製用のリニアライズされた導入遺伝子断片調製の過程を示す図である。

【図 4】

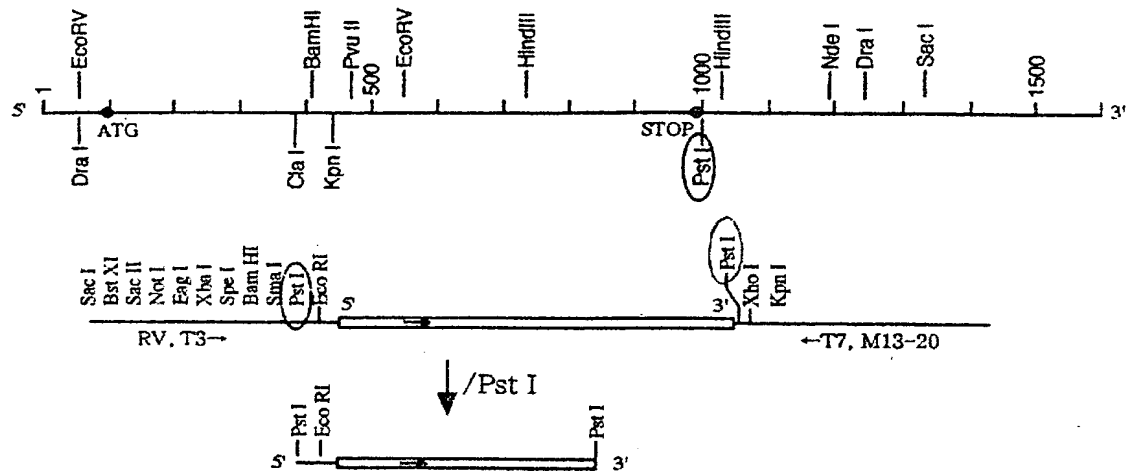
本発明のトランスジェニックラット中のレギュカルチン遺伝子の P C R による

●
確認におけるプライマーの位置を示す図である。

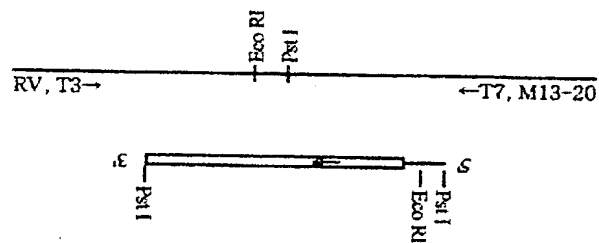
【書類名】 図面

【図 1】

A



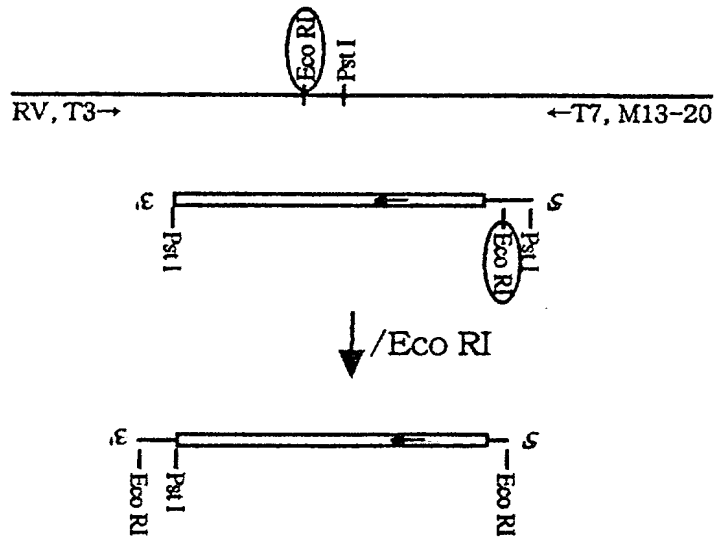
B



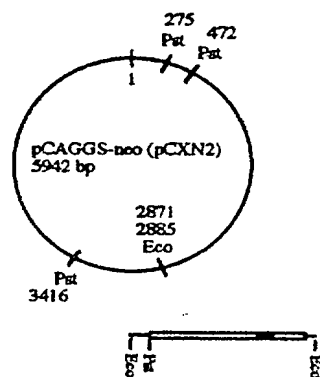
【図 2】

【図 2】

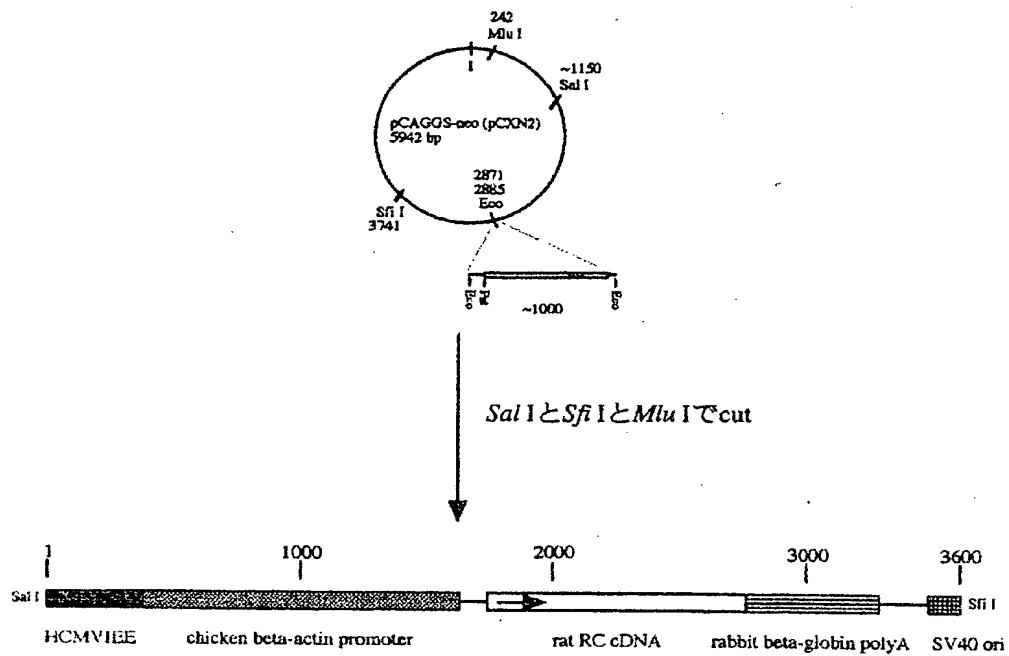
A



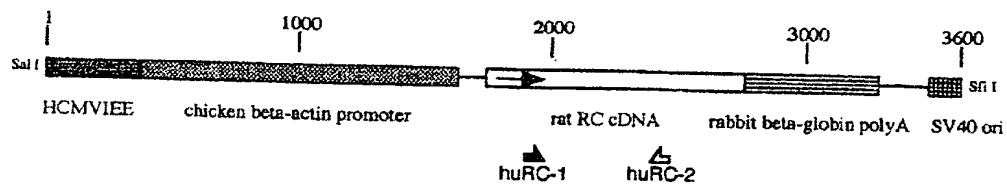
B



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 元来高等動物の肝臓等に発現しているレギュカルチン（RC）を過剰に発現させ、他の数多くのCa²⁺結合タンパク質とのバランスを崩した場合に、生体にどのような変化・影響が生じるかを調べるためのツールであるRC過剰発現モデル動物を提供すること。

【解決手段】 ラット肝臓cDNAライブラリーからRC cDNAをクローニングし、RC蛋白質の全長をコードするcDNAを単離し、このラットRC全長cDNAよりORFを切り出し、発現ベクター（pCXN2）に導入し、この遺伝子発現ベクターをラット受精卵雄性前核にマイクロインジェクションし、この受精卵を仮親ラットの卵管に移植し、子ラットを発生させ、その産仔の組織からDNAを抽出し、PCR法によってRC cDNAが組み込まれているラットを確認する。ホモ体のRCトランスジェニックラットは、体重の増加が有意に抑制される。

特願 2 0 0 1 - 2 8 7 6 9 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 2 月 2 4 日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

科学技術振興事業団